

Title	ハーブティーの新たな可能性の探求
Author(s)	平田, 陽暉
Citation	令和元（2019）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書
Issue Date	2020-06
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/75983
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

2019年度大阪大学未来基金【住野勇財団】学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏名	ひらた はるき 平田 陽暉	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	1 年
ふりがな 共 同 研究者氏名	いいもり みなと 飯森 南斗	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	1 年
	えんどう ゆうか 円藤 悠花				
	きたもと なつこ 北本 夏子				
	さかい ひびき 坂井 響				
	しまだ ゆうき 島田 悠妃				
	ばば たいよう 馬場 太陽				
	みやま さくら 見山 さくら				
	やまだ まなみ 山田 麻奈未				
	やりみずせいな 鎗水 星奈				
	アドバイザー教員 氏名				
研究課題名	ハーブティーの新たな可能性の探求				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

【研究目的】

現在痛み止めとして広く使用されているアスピリン(アセチルサリチル酸)は柳から単離された。柳は古くから鎮痛作用があることが知られており、治療などに用いられてきた。古くからの言い伝えには科学的根拠に欠けるものも多いが、長く用いられてきたものには実際に効果があるものも多いと推察でき、さらにその経験から安全性は確保されていると考えられるため、可能性の宝庫であると言える。ドイツなどのヨーロッパ諸国では古くからハーブティーが薬として用いられており、その力には注目が集まっている。本研究ではこれらのことからハーブティーを取り上げるに至った。

薬の服用、特に抗生物質の服用には受診が必要となり、疾病の予防としては利用しがたいのが現状である。ハーブティーは日常生活でも取り入れられてきた身近なものであるため抗菌活性が証明されれば、より簡便な疾病の予防が可能となり、さらには、食品や化粧品のための自然由来の安全性の高い防腐剤の開発につながる可能性がある。

また、体内の活性酸素が様々な疾病の原因となっていることから、抗酸化活性を持つ物質が注目されている。ハーブティーの抗酸化作用が証明されれば、同様に簡便な疾病の予防につながると考えられる。

以上より、本実験ではハーブティーの抗菌活性と抗酸化活性について調査し、報告を行う。

【実験方法】**1、抗菌活性試験****実験 1-1 ペーパーディスク法を行う上で適切な大腸菌濃度の検討**

本実験では抗菌活性を調査するために、ペーパーディスク法を用いた。その予備検討として、シャーレ全体にまんべんなくコロニーが形成される大腸菌の濃度の検討を行った。大腸菌の懸濁液の OD_{600}^1 の値を計測し、10 倍ずつ希釈し、LB 寒天培地一枚当たり 50 μL を塗布した。その後 37°C で 24 時間培養し観察を行った。なお、抗菌活性試験にはすべて *E.coli* JM109 株を用いた。

実験 1-2 ペーパーディスク法を用いた抗菌活性試験

19 種類のハーブティー(タイム、フェンネル、エルダーフラワー、エキナセア、フィバーフュー、アニスシード、レモンバーム、マローブルー、マレイン、オレガノ、ペパーミント、キャットニップ、ヒソップ、ローズヒップ、リコリス、バンランコン、クローブ、カモミール、セージ)を用いた。各ハーブティー 1 g に沸騰させた蒸留水 10 ml を加え 10 分間放置し、抽出液を作成した。大腸菌の懸濁液 50 μL を塗布した LB 培地上にペーパーディスクを置き、各ディスクに原液、5 倍希釈、25 倍希釈の抽出液をそれぞれ 40 μL ずつしみこませ 37°C で 24 時間培養を行った。またコントロールとして蒸留水を 40 μL しみこませたものを作成し、同様に培養を行った。その後阻止円の有無の観察を行った。

実験 1-3 培養液へのサンプル抽出液添加による抗菌活性試験

19 種類のサンプルの抽出液及びコントロールの蒸留水それぞれ 90 μL に大腸菌の懸濁液 10 μL を混合した。この混合液をそれぞれ 50 μL ずつ LB 培地に塗布し、37°C で 24 時間培養し、形成されるコロニーの数を計測した。

実験 1-4 実験 1-3 の追加実験

実験 1-3 で用いた大腸菌の懸濁液の濃度の 10 倍の濃度の懸濁液を用いて同様の実験を行った。また、懸濁液と抽出液の混合液を作成後 30 分間放置し、大腸菌が高濃度の抽出液に触れる時間を長くして行った。

実験 1-5 強い抗菌活性を有する可能性のあるサンプルの再検証

実験 1-4 で形成されたコロニーが少なかったサンプル(タイム、エルダーフラワー、オレガノ、クローブ、セージ)について、また、オレガノとクローブを 1:1 で混合した混合液について、原液、10 倍

希釈、100 倍希釈の抽出液を用いて同様の実験を行った。なお、この実験では大腸菌とサンプルを混合後すぐに培地に塗布した。

実験 1-6 実験 1-5 の追加実験①

実験 1-5 で特に抗菌活性がみられたサンプル(オレガノ、クローブ、二つの混合液)について、原液、2 倍希釈 5 倍希釈の抽出液を用いて同様の実験を行った。また、この実験では混合後 30 分間放置した。さらにコントロールの信頼性を高めるため、コントロールを 3 つ設け実験を行った。

実験 1-7 追加実験②

実験 1-6 と同様の実験をサンプル数をそれぞれ 3 にして行った。(ただし原液のみサンプル数 1)

実験 1-8 追加実験③

オレガノとクローブを用いて実験を行った。大腸菌の懸濁液と抽出液を混合後 30 分間放置したものと、2 時間放置したものについてそれぞれサンプル数 2 で同様の実験を行った。

実験 1-9 殺菌作用であるのか、静菌作用であるのかの検証

適切な濃度に希釈した大腸菌の懸濁液と 2 種類のハーブティー(オレガノとクローブ)も抽出液を 1:1 で混合したものの OD₆₀₀ の値を混合直後、2 時間後、17 時間半後に計測した。またコントロールとして蒸留水を加えたものを用意した。それぞれサンプル数 3 で実験を行った。

2、抗酸化活性試験

抗菌活性試験と同様の 19 種類のハーブティーから抽出した抽出液を用いて実験を行った。各サンプルを 50 倍希釈したものを用いて ECL 測定法²で抗酸化活性を調査した。2.0 mM、1.0 mM、0.5 mM、0 mM の濃度に希釈した Trolox でこの試験を行い、検量線を作成した。各サンプルにつき 2 回ずつこの試験を行い、ピーク値の平均を Trolox と比較することで抗酸化の指標とした。また一般的に抗酸化作用があるとされる飲料であるコーヒーでも同様の試験を行い、比較した。

【結果】

1、抗菌活性試験

結果 1-1 ペーパーディスク法を行う上で適切な大腸菌濃度の検討

大腸菌の懸濁液の原液は OD₆₀₀ の値が 1.08 であった。試験の結果この懸濁液を 100 倍に希釈し、50 μL を培地に塗布すると一面にコロニーが形成された。

結果 1-2 ペーパーディスク法を用いた抗菌活性試験

19 種類のハーブティーとコントロールについて、この試験ではどのサンプルでも阻止円が形成されなかった。

結果 1-3 培養液へのサンプル抽出液添加による抗菌活性試験

結果を Table1 に示す。

Table1. サンプル毎の形成されたコロニー数

サンプル名	コロニー数	サンプル名	コロニー数
タイム	38	ペパーミント	52
フェンネル	46	キャットニップ	21
エルダーフラワー	52	ヒソップ	64
エキナセア	62	ローズヒップ	32
フィーバーフュー	75	リコリス	58
アニスシード	22	バンランコン	47
レモンバーム	82	クローブ	0
マローブルー	83	カモミール	40
マレイン	92	セージ	0
オレガノ	0	Control	62

結果 1-4 実験 1-3 の追加実験

結果を Table2 に示す。また、コントロールではコロニー同士が重なって形成していたため、計測することができなかった。

Table2. サンプル毎の形成されたコロニー数

サンプル名	コロニー数	サンプル名	コロニー数
タイム	196	ペパーミント	626
フェンネル	841	キャットニップ	956
エルダーフラワー	387	ヒソップ	761
エキナセア	929	ローズヒップ	590
フィーバーフュー	739	リコリス	736
アニスシード	675	バンランコン	882
レモンバーム	754	クローブ	0
マローブルー	703	カモミール	622
マレイン	535	セージ	773
オレガノ	0	Control	1000 以上

結果 1-5 強い抗菌活性を有する可能性のあるサンプルの再検証

結果を Table3 に示す。また、セージの 10 倍希釈のものに関してはコンタミネーションが発生し、計数できなかったため、計数不可と表記した。

Table3. サンプルの希釈ごとのコロニー数

サンプル名	1/1	1/10	1/100
タイム	123	98	133
エルダーフラワー	160	185	173
オレガノ	25	175	191
クローブ	36	208	155
セージ	107	計数不可	123
オレガノ+クローブ	3	259	156
Control	59	—	—

結果 1-6 実験 1-5 の追加実験①

結果を Table4 に示す。

Table4. サンプルの希釈ごとのコロニー数

サンプル名	1/1	1/2	1/5
オレガノ	0	86	102
クローブ	0	74	114
オレガノ+クローブ	0	109	87
Control-1	137	—	—
Control-2	147	—	—
Control-3	187	—	—

結果 1-7 追加実験②

結果を Table5 に示す。

Table5. サンプルの希釈ごとのコロニー数

サンプル名	1/1	1/2	1/5
オレガノ-1	0	126	155
オレガノ-2	—	75	170
オレガノ-3	—	89	212
クローブ-1	0	94	162
クローブ-2	—	141	201
クローブ-3	—	174	205
オレガノ+クローブ-1	0	73	181
オレガノ+クローブ-2	—	107	206
オレガノ+クローブ-3	—	71	229
Control-1	146	—	—
Control -2	145	—	—
Control -3	163	—	—

結果 1-8 追加実験③

結果を Table6 に示す。

Table6. 混合後の放置時間と各サンプルのコロニー数の関係

サンプル名と希釈率	30 m	2 h
オレガノ(1/1)-1	0	3
オレガノ(1/1)-2	1	0
オレガノ(1/2)-1	297	138
オレガノ(1/2)-2	149	168
クローブ(1/1)-1	0	0
クローブ(1/1)-2	0	0
クローブ(1/2)-1	351	127
クローブ(1/2)-2	353	222
Control-1	539	633
Control-2	470	481

結果 1-9 殺菌作用であるのか、静菌作用であるのかの検証

結果を Table7 に示す。

Table7. 各サンプルの時間ごとの OD₆₀₀ の値

サンプル名	0 m	2 m	17 h30 m
オレガノ-1	0.022	0.059	0.097
オレガノ-2	0.022	0.030	0.117
オレガノ-3	0.018	0.051	0.111
クローブ-1	0.007	0.026	0.592
クローブ-2	0.004	0.022	0.639
クローブ-3	0.011	0.028	0.667
Control-1	0.013	0.050	2.19
Control -2	0.015	0.043	2.48
Control -3	0.001	0.041	2.39

2、抗酸化活性試験

それぞれのサンプルのピーク値を Table8 に、ピーク値の平均と Trolox 換算値を Table9 に示す。また Figure1 は Trolox 換算値を棒グラフにあらわしたものである。ペパーミントに関しては抗酸化活性が大きかったため、さらに二倍に希釈し計測を行い、値を二倍にしたものを使用した。フェンネル、アニスシード、バンランコンについてはこの方法では正確に抗酸化活性の強度を測ることができないほど弱い活性だったため、ND とした。

Table8. 各サンプルのピーク値

サンプル名	1 回目	2 回目	サンプル名	1 回目	2 回目
タイム	403360	439520	ペパーミント	67200	70480
フェンネル	1028240	960960	キャットニップ	792320	780000
エルダーフラワー	285360	296000	ヒソップ	424560	507280
エキナセア	676480	730480	ローズヒップ	559200	553120
フィーバーフュー	909760	899840	リコリス	508160	482560
アニスシード	1011760	959760	バンランコン	925200	1161840
レモンバーム	136160	120080	クローブ	676800	643200
マローブルー	357920	359520	カモミール	470880	435280
マレイン	434560	437280	セージ	641920	750160
オレガノ	133360	138800			

Table9. 各サンプルのピーク値の平均と Trolox 換算値(mM)

サンプル名	Ave.	Trolox 換算	サンプル名	Ave.	Trolox 換算
タイム	421440	1.139843	ペパーミント	248280	1.522609×2
フェンネル	994600	ND	キャットニップ	786160	0.33364
エルダーフラワー	290680	1.428885	ヒソップ	470480	1.031442
エキナセア	703480	0.516402	ローズヒップ	556160	0.842048
フィーバーフュー	904800	0.071389	リコリス	495360	0.976445
アニスシード	1041680	ND	バンランコン	1037973	ND
レモンバーム	128120	1.788219	クローブ	660000	0.612513
マローブルー	358720	1.278484	カモミール	453080	1.069904
マレイン	435920	1.107836	セージ	682160	0.563529
オレガノ	136080	1.770624	コーヒー	618293.3333	0.422002×2

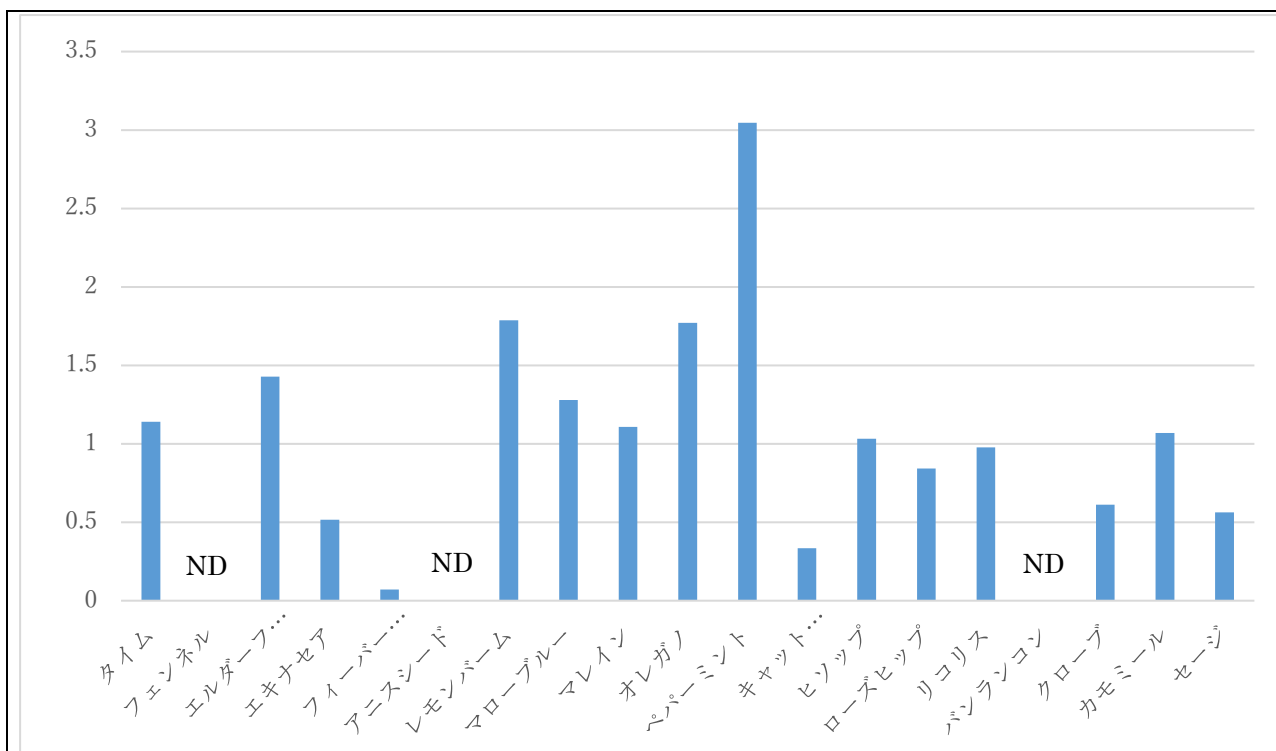


Figure1. サンプルと Trolox 換算値

【考察】

1、抗菌活性試験

考察 1-2

ペーパーディスク法を用いた抗菌活性試験で阻止円が形成されなかった理由としては、ハーブティーの抽出液と大腸菌が高濃度で触れ合う機会が少なかったことが考えられる。実際、その後の実験では抗菌活性のあるサンプルが認められたため、今回抗菌活性がみられたサンプルに関しては、一定時間高濃度で触れ合う機会が必要だと考えられる。

考察 1-3、1-4、1-5

実験 1-3 でセージを用いるとコロニーがみられなかったが、その後の実験の結果も考慮すると実験 1-3 では大腸菌の懸濁液を加え忘れたためコロニーが形成されなかったと考えられる。また、実験 1-3 ではコロニー数が少なく比較しづらかったが、実験 1-4 では形成されたコロニー数が多く、サンプル毎にかなりの差がみられた。また、実験 1-5 でタイムなどには目立った活性がみられなかったが、その後の実験でオレガノやクローブを 2 倍に希釈しただけで効果が格段に薄れたことから、抽出の濃度を変えればこれらのサンプルでも活性がみられるかもしれない。

考察 1-6、1-7

実験 1-7 の結果をサンプル毎に平均をとり、濃度とコロニー数のグラフを作成すると Figure2 のようになった。グラフからわかるように抽出液の濃度と抗菌活性の強弱にはある程度の相関があると考えられる。

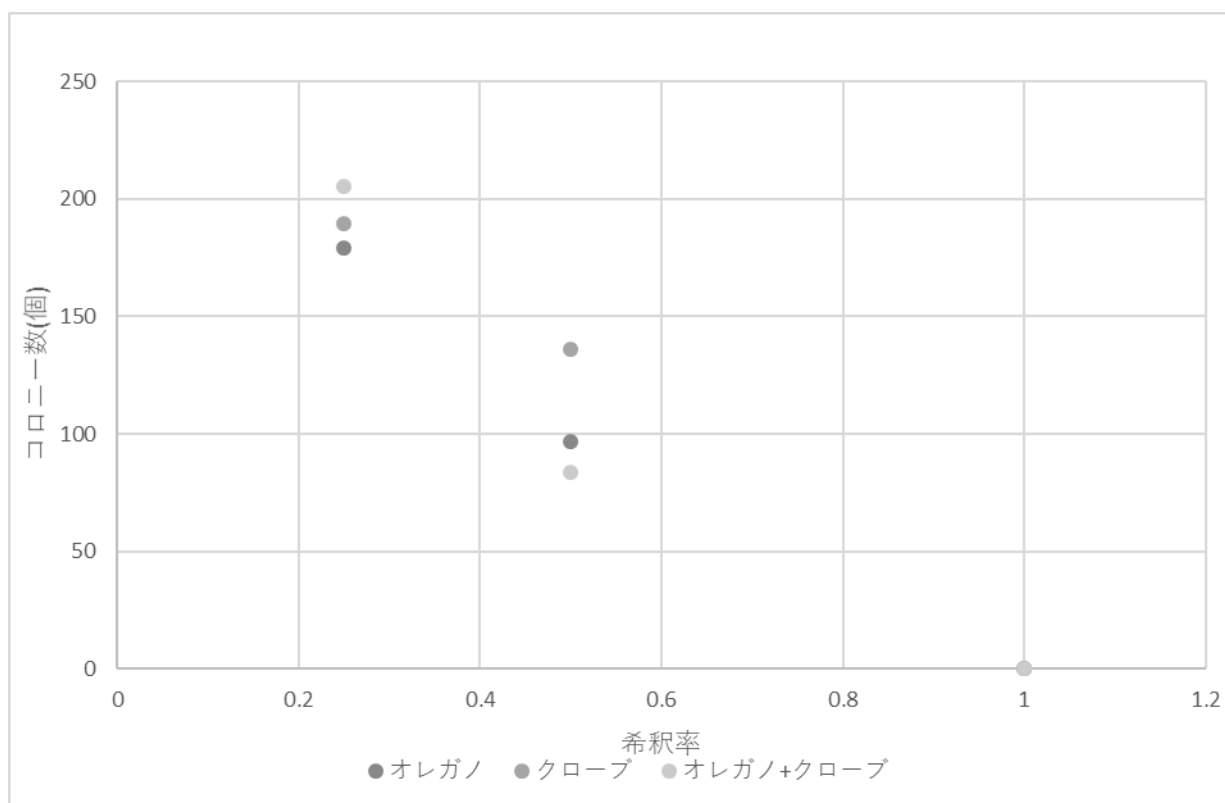


Figure2. 抽出液の濃度とコロニー数の関係

考察 1-8

コントロールでは時間をおいてもコロニーの数はあまり変化しなかったが、抽出液を加えたものに関しては原液でも、2 倍希釈でも 2 時間放置したもののほうがコロニー数が少なかった。したがって、長い時間放置する(高濃度で抽出液と菌が触れ合う時間を長くする)ことで、より抗菌活性が望めると考えられる。

考察 1-9

培養開始直後の値と、17 時間半後の値を比較すると、オレガノもクローブも菌は増殖しているがコントロールと比べるとその増殖を抑えていたことは明らかである。したがって、この二つのサンプルに関しては静菌作用を有していると判断した。

2. 抗酸化活性試験

コーヒーは市販の缶コーヒーを使用した。ハーブティーのサンプルは飲料としては濃度がかなり濃いため、単純に比較はできないが、今回の濃度では、コーヒーと比較してもかなり優秀な抗酸化活性を持つサンプルがいくつか見られた。特にペパーミントに関してはコーヒーの約 4 倍の抗酸化活性を持つことが明らかになった。

また、Trolox 換算値を縦軸に、実験 1-4 の結果を横軸にとったグラフを Figure3 に示す。抗菌活性と抗酸化活性に相関は見られなかった。したがって抗菌活性と抗酸化活性は別の物質がそれぞれ働いていると考えられる。

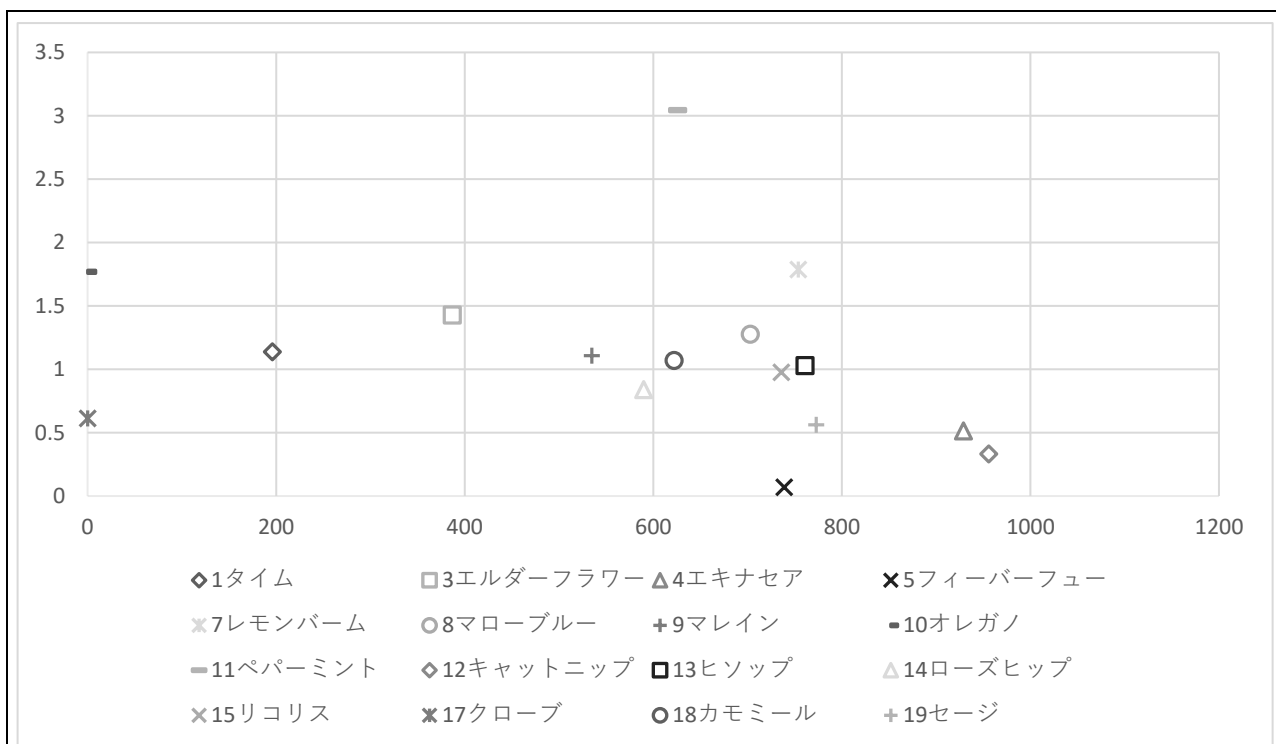


Figure3. 抗菌活性と抗酸化活性の関係

【今後の展望】

考察でも述べたように、濃度によってかなり活性の強弱が変化するため、今回抽出した濃度よりも濃い抽出液を使用すると、はっきりと活性がみられる可能性がある。今回活性があると認めたサンプル以外にも活性のあるサンプルが認められるかもしれないため、さらに濃い濃度の抽出液を用いた試験を行う必要がある。

また今回活性があると認めたサンプルに関しては飲料として使用するにはかなり濃い濃度であるため、飲料としての応用はあまり期待できないが、静菌作用が認められたため食品中の菌の増殖を抑える添加物として応用が期待できる。

抗酸化活性に関してはさらに研究を行い進めれば、かなり優秀な抗酸化活性を持つ物質として薬品などにも応用が可能だと考えられる。

【参考文献】

- 1.小西正朗、堀内淳一.細胞の増殖を捉えるー計測法から比速度算出までー.生物工学第 93 巻
2. Eiichi Tamiya, Yuki Inoue, and Masato Saito. Luminol-based electrochemiluminescent biosensors for highly sensitive medical diagnosis and rapid antioxidant detection. Japanese Journal of Applied Physics2018:57